

**METHOD FOR MULTIPLYING NUCLEIC ACID SEQUENCE AND METHOD FOR DETECTING SAME**

**Patent number:** JP6327500  
**Publication date:** 1994-11-29  
**Inventor:** TAKARADA YUTAKA; others: 02  
**Applicant:** TOYOBO CO LTD  
**Classification:**  
- **International:** C12Q1/68; C12N15/10  
- **European:**  
**Application number:** JP19930118616 19930520  
**Priority number(s):**

**Abstract of JP6327500**

**PURPOSE:** To provide a method for simply multiplying a specific nucleic acid sequence, and a method for easily detecting a specific nucleic acid.

**CONSTITUTION:** A method for multiplying a nucleic acid comprises synthesizing a DNA in the presence of a single strand DNA as a template, a RNA as a polymerase and a DNA polymerase and subsequently synthesizing the RNA in the presence of a RNA polymerase and the synthesized double strand DNA as a template, and a method for detecting a target nucleic acid comprises adding a target oligonucleotide to the nucleic acid multiplication product produced by the above multiplication method and subsequently subjecting the mixture to a hybridization.

---

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-327500

(43) 公開日 平成6年(1994)11月29日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A Z	7823-4B		
C 1 2 N 15/10				

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平5-118616

(22) 出願日 平成5年(1993)5月20日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 近藤 元宏

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 小松原 秀介

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(54) 【発明の名称】 核酸配列の増幅方法および検出方法

(57) 【要約】

【目的】 目的とする特定核酸配列を簡便に増幅し、また特定核酸を簡便に検出する方法を提供する。

【構成】 一本鎖DNAを鋳型とし、RNAをプライマーとしてDNAポリメラーゼの存在下、DNAを合成し、合成された2本鎖DNAを鋳型としてRNAポリメラーゼによりRNAを合成することを特徴とする核酸配列の増幅方法および前記増幅法により生成した核酸増幅産物に、標識オリゴヌクレオチドを加え、ハイブリダイゼーションを行い、標的核酸を検出する方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する一本鎖DNAを鋳型とし、RNAをプライマーとしてDNAポリメラーゼの存在下、DNAを合成し、合成された二本鎖DNAを鋳型としてRNAポリメラーゼによりRNAを合成することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項2】 下記操作を含むことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作a) RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する一本鎖DNAを鋳型とし、RNAをプライマーとしてDNAポリメラーゼの存在下、DNAを合成する。

操作b) 合成された二本鎖DNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作c) 前記一本鎖DNAを鋳型とし、合成されたRNAをプライマーとしてDNAポリメラーゼの存在下、DNAを合成する。

操作d) 操作b) および操作c) を少なくとも1回繰り返す。

【請求項3】 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する一本鎖DNA、RNA、DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、RNAポリメラーゼ、4種のリボヌクレオシド三リン酸および反応緩衝液を含むことを特徴とする核酸配列の増幅のための試薬。

【請求項4】 請求項1または請求項2または請求項3において生成した核酸増幅物に、検出されるべき配列及び／又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを加え、該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定することにより、標的核酸を検出することを特徴とする標的核酸配列の検出方法。

【請求項5】 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する一本鎖DNA、RNA、DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、RNAポリメラーゼ、4種のリボヌクレオシド三リン酸および反応緩衝液ならびに検出されるべき配列及び／又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを含むことを特徴とする核酸配列の検出のための試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、試料中に存在する特定の核酸配列を増幅する方法および該核酸配列を検出する方法に関する。特に、本発明は与えられた核酸から、任意に特定の核酸配列を初期に存在する量に比較してより大量に生成させる方法およびこの方法を用いて生成された核酸配列から目的の核酸配列を検出する方法に関する。

【従来技術】 近年、核酸ハイブリダイゼーション法による試料中の核酸配列の検出は、遺伝病、癌、感染症等の診断のために有効な手段として汎用されてきている。核酸配列検出法において、標的となる塩基配列は、対象となる核酸のほんのわずかな部分である場合が多く、酵素やタンパクなどを標識とする非放射性標識プローブや末端を放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いた検出法では、感度上の問題等によりその検出が困難である。そのため、オリゴヌクレオチド・プローブ検出システムの感度を向上させるためには多くの努力がなされている（W087/03622など）。

【0003】 また、感度向上の手段として、目的とする特定核酸配列を熱安定性DNAポリメラーゼ等を使用して増幅させる方法（特開昭61-274697号公報等；以下「PCR」と略することがある）が広く知られている。しかしこの方法では、プライマーのアニール、伸長反応、変性を繰返すために加熱および冷却操作を繰返して頻繁に行なう必要があり、特別の機器を用いるか、又は繁雑な労力を要する。また、該方法ではプライマーとして2本のオリゴヌクレオチドを用いる必要があるが、これらのプライマーが非特異的に試料中の核酸又は他の試料から混入した核酸にアニールした場合でもDNAポリメラーゼによる増幅が起こる場合があり、プライマーの特異性が厳しく要求されている。

【0004】 さらにDNAリガーゼを用いる増幅法も提案されている（W0089/12696、特開平2-2934号公報など）。しかし、この方法ではDNAリガーゼが平滑末端を連結する反応（blunt end ligation）により非特異的増幅が起こる。この回避法としてW0089/12696では3組以上のプローブを用いているが、プローブ数が多くコスト高になってしまう。

【0005】 さらにDNAリガーゼとDNAポリメラーゼを組合せた方法が提案され、その一つの方法（W090/01069）では、2組4本以上のオリゴヌクレオチドを用いる必要があり、コストが高くなるという問題がある。他法（特開平2-268683号公報）では、3本のオリゴヌクレオチドを必要とし、そのうちの2本は数十ヌクレオチドを必要とするのでコストが高くなる。

【0006】 また、RNAポリメラーゼを用いてDNAよりRNAが生成されることは周知であり、RNAポリメラーゼを用いて核酸配列の増幅を行う方法も提案されている（W0089/01050）。しかしながら、この方法ではRNAポリメラーゼによる転写増幅のみでは十分な増幅は困難である。従って、生成したRNAに再度、逆転写酵素を作用させDNAを生成させる操作を実施している。一般的に逆転写酵素によるDNAへの転写は、DNAポリメラーゼによるDNA複製に比べて、読取り間違いを生じ易いという欠点がある。

【0007】 一方、目的とする核酸に核酸プローブをハ

ープのみを増幅する方法 (BIO/TECHNOLOGY vol. 6, 119 7, 1988) も知られている。しかしこの方法では、非特異反応により結合したプローブも増幅され、ブランク値の上昇をきたすという問題がある。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、目的とする特定核酸配列を簡便に増幅し、また特定核酸を簡便に検出する方法を提供することである。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らはこれらの課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、RNAをプライマーとして用いることにより、上記課題が解決されることを見出して、本発明に到達した。

【0010】即ち、本発明はRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する一本鎖DNAを鋳型とし、RNAをプライマーとしてDNAポリメラーゼの存在下、DNAを合成し、合成された2本鎖DNAを鋳型としてRNAポリメラーゼによりRNAを合成することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。

【0011】また本発明は下記操作を含むことを特徴とする核酸配列の増幅方法である。

操作a) RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する一本鎖DNAを鋳型とし、RNAをプライマーとしてDNAポリメラーゼの存在下、DNAを合成する。

操作b) 合成された2本鎖DNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作c) 前記一本鎖DNAを鋳型とし、合成されたRNAをプライマーとしてDNAポリメラーゼの存在下、DNAを合成する。

操作d) 操作b) および操作c) を少なくとも1回繰り返す。

【0012】さらに本発明はRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する一本鎖DNA、RNA、DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、RNAポリメラーゼ、4種のリボヌクレオシド三リン酸および反応緩衝液を含むことを特徴とする核酸配列の増幅のための試薬である。

【0013】また本発明は上記増幅方法において生成した核酸増幅物に、検出されるべき配列及び/又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを加え、該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定することにより、標的核酸を検出することを特徴とする標的核酸配列の検出方法である。

【0014】さらに本発明はRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する一本鎖DNA、RNA、DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTPs)、RNAポリメラーゼ、4種のリボヌクレオシド三リン酸 (rNTPs) および反応緩衝液なら

りダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを含むことを特徴とする核酸配列の検出のための試薬である。

【0015】本発明においてプライマーとして使用するRNAは、いかなるものでもよいが、試料中の標的核酸を検出する場合には、試料中に含まれる少なくとも一つの特異核酸配列の一部の配列を含むRNAであることが好ましい。また特定核酸配列の一部の配列を含むRNAとしては、該特定核酸配列の一部の配列を含むDNAを鋳型とし、RNAポリメラーゼで合成されたRNAであってもよい。なお、該核酸は単鎖でも二重鎖でも良く、比較的純粋な状態であっても、混合物の成分であってもよい。

【0016】特定核酸配列の一部の配列を含むDNAを鋳型とし、RNAポリメラーゼで合成されたRNAとしては、下記操作により得られたものが例示される。

例 A: 下記の操作を含むことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくとも特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドおよび特定核酸配列の一部の3'下流の一部に相補的な塩基配列を有する第二オリゴヌクレオチドを試料中の核酸と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列に上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

操作b) 前記第一および第二オリゴヌクレオチドを連結酵素により連結する。

操作c) 操作b) で得られた連結産物を鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

【0017】例 B: 下記の操作を含むことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくともRNAポリメラーゼのプロモーター配列および特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドおよび特定核酸配列の一部の5'上流の一部に相補的な塩基配列を有する第二オリゴヌクレオチドを試料と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列と上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

操作b) 前記第一および第二オリゴヌクレオチドを連結酵素により連結する。

操作c) 操作b) で得られた連結産物を一本鎖とし、第二オリゴヌクレオチドと相補的な第三オリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作d) 操作c) で合成されたDNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成させる。

【0018】例 C: 下記の操作を含むことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくとも

配列の一部に相補的な塩基配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドを試料と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列と上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

操作b) 前記第一オリゴヌクレオチドをプライマーとして伸長反応させる。

操作c) 操作b) で得られた伸長生成物を一本鎖にし、該伸長生成物の一部に相補的な配列を有する第二オリゴヌクレオチドをアニールさせ、伸長反応させる。

操作d) 操作c) で得られた伸長生成物を鋳型とし、RNAポリメラーゼでRNAを合成させる。

【0019】次に例Aに記載されるRNAをプライマーとする核酸配列増幅方法について説明する。本発明の増幅方法(例A)は、下記操作を含むものである。

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくとも、特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドおよび特定核酸配列の一部の3'下流の一部に相補的な塩基配列を有する第二オリゴヌクレオチドを試料中の核酸と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列と上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

操作b) 前記第一および第二オリゴヌクレオチドを連結酵素により連結する。

操作c) 操作b) で得られた連結産物を鋳型としRNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

さらに本発明の増幅方法(例A')は、下記操作を含んでいてもよい。

操作d) 操作c) で得られたRNAをプライマーとし、操作c) で得られたRNAと相補的な配列、操作c) で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型とし、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作e) 操作d) で合成された2本鎖DNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作f) 操作e) で合成されたRNAをプライマーとし、操作c) で得られたRNAと相補的な配列、操作c) で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

これらの操作は逐次的に又は同時に行なうことができる。

【0020】また本発明の増幅方法(例A'')は、下記操作を含む。

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくとも、特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドおよび特定核酸配列の一部の3'下流の一部に相補的な塩基配列を有する第二オリゴヌクレオチドを試料中の核酸と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列と上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

結酵素により連結する。

操作c) 操作b) で得られた連結産物を鋳型としRNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作d) 操作c) で得られたRNAをプライマーとし、操作c) で得られたRNAと相補的な配列、操作c) で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型とし、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作e) 操作d) で合成された2本鎖DNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作f) 操作e) で合成されたRNAをプライマーとし、操作c) で得られたRNAと相補的な配列、操作c) で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作g) 操作f) で合成された2本鎖DNAを鋳型としてRNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作h) 操作g) で合成されたRNAをプライマーとし、操作c) で得られたRNAと相補的な配列、操作c) で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作i) 必要により操作g) および操作h) を少なくとも一回繰り返す。

【0021】操作b) で得られた連結DNAを分離する操作を含んでいてもよい。好ましくは操作d) の工程以後に分離する操作を含む。これらの操作は逐次的に又は同時に行なうことができる。

【0022】本発明の第一オリゴヌクレオチドは、5'末端から3'末端に向って、少なくとも特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列とRNAポリメラーゼのプロモーター配列を順次有するように設計されており、第二オリゴヌクレオチドは特定核酸配列の一部の3'下流の一部に相補的な塩基配列を有するように設計されていれば、構造、長さに制限されない。一般的に、特定核酸の一部に相補的な塩基配列の長さは、6~100ヌクレオチド、好ましくは10~30ヌクレオチドの長さが使用される。

【0023】本発明の第一オリゴヌクレオチドにおいて、RNAポリメラーゼのプロモーター配列と特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列との間に、所望によりスパーサーを設けることも可能である。このスパーサーは一般的に1~100個、好ましくは1~20個のヌクレオチドであればよい。

【0024】本発明の一本鎖DNAは少なくとも操作c) で得られたRNAと相同な配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列、操作c) で得られたRNAと相補的な配列を有するように設計されていれば、構造、長さに制限されない。一般的に、前記RNAの一部に相補

レオチド、好ましくは10~30ヌクレオチドの長さが使用される。

【0025】これらオリゴヌクレオチドは、例えばABI社 (Applied Biosystems Inc.) のDNAシンセサイザー391型を用いてホスホアミダイト法により合成できる。他にもリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスファイト法等いかなる方法で合成してもよい。また、生物学的起源、例えば制限エンドヌクレアーゼ消化物から単離してもよい。

【0026】操作c)において生成した連結産物を分離するには第一オリゴヌクレオチドおよびまたは第二オリゴヌクレオチドにビオチンを結合させておき、連結反応の後にアビジン結合磁性ビーズ等を用いることが可能である。

【0027】本発明の特定核酸配列増幅のための試薬は、5'末端から3'末端に向って、少なくとも、特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を順次有する第一オリゴヌクレオチド、特定核酸配列の一部の3'下流の一部に相補的な塩基配列を有する第二オリゴヌクレオチド、連結酵素、RNAポリメラーゼ、4種のリボヌクレオシド三リン酸、DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレシド三リン酸および反応緩衝液を含む。

【0028】また本発明の核酸配列増幅のための試薬は、上記成分の他に、前記第一および第二オリゴヌクレオチドを連結酵素により連結し、該連結産物を鋳型としRNAポリメラーゼにより合成したRNAと相補的な配列、同じRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを含む。

【0029】次に例示Bに記載されるRNAをプライマーとする核酸配列増幅方法を説明する。本発明の核酸配列の増幅方法(例B)は、下記操作を含む。

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくともRNAポリメラーゼのプロモーター配列および特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドおよび特定核酸配列の一部の5'上流の一部に相補的な塩基配列を有する第二オリゴヌクレオチドを試料と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列と上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

操作b) 前記第一および第二オリゴヌクレオチドを連結酵素により連結する。

操作c) 操作b)で得られた連結産物を一本鎖とし、第二オリゴヌクレオチドと相補的な第三オリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作d) 操作c)で合成されたDNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

さらに本発明の増幅方法(例B')は、下記操作を含んでいてもよい。

て、操作d)で得られたRNAと相補的な配列、操作d)で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作f) 操作e)で合成された2本鎖DNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作g) 操作f)で合成されたRNAをプライマーとし、操作d)で得られたRNAと相補的な配列、操作d)で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

これらの操作は逐次的に又は同時に行なうことができる。

【0030】また本発明の増幅方法(例B'')は、下記操作を含む。

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくともRNAポリメラーゼのプロモーター配列と、特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドおよび該特定核酸配列の一部の5'上流の一部に相補的な塩基配列を有する第二オリゴヌクレオチドを試料中の核酸と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列と上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

操作b) 前記第一および第二オリゴヌクレオチドを連結酵素により連結する。

操作c) 操作b)で得られた連結産物を一本鎖にし、第二オリゴヌクレオチドと相補的な第三オリゴヌクレオチドをプライマーとして、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作d) 操作c)で合成されたDNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作e) 操作d)で得られたRNAをプライマーとして、操作d)で得られたRNAと相補的な配列、操作d)で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作f) 操作e)で合成された2本鎖DNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作g) 操作f)で合成されたRNAをプライマーとし、操作d)で得られたRNAと相補的な配列、操作d)で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

操作h) 操作g)で合成された2本鎖DNAを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。

操作i) 操作h)で合成されたRNAをプライマーとし、操作d)で得られたRNAと相補的な配列、操作d)で得られたRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型として、DNAポリメラーゼによりDNAを合成する。

とも一回繰り返す。

これらの操作は逐次的に又は同時に行なうことができる。

【0031】本発明の増幅方法では操作c)で得られた鋳型DNAを分離する操作を含んでもよい。

【0032】本発明の第一オリゴヌクレオチドは、5'末端から3'末端に向って、少なくとも、RNAポリメラーゼのプロモーター配列と特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有するように設計されており、第二オリゴヌクレオチドは特定核酸配列の一部の3'下流の一部に相補的な塩基配列を有するように設計されている。第三オリゴヌクレオチドは、第二オリゴヌクレオチドと相補的な配列に設計されていれば、構造、長さ制限されない。一般的に、前記核酸の一部に相補的な塩基配列の長さは、6~100ヌクレオチド、好ましくは10~30ヌクレオチドの長さが使用される。

【0033】本発明の第一オリゴヌクレオチドにおいて、RNAポリメラーゼのプロモーター配列と特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列との間に、所望によりスペーサーを設けることも可能である。このスペーサーは一般的に1~100個、好ましくは1~20個のヌクレオチドであればよい。

【0034】本発明の一本鎖DNAは、少なくとも操作d)で得られたRNAと相同な配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列、操作d)で得られたRNAと相補的な配列を有するように設計されていれば、構造、長さに制限されない。一般的に、前記RNAの一部に相補的およびまたは相同な塩基配列の長さは、6~100ヌクレオチド、好ましくは10~30ヌクレオチドの長さが使用される。

【0035】操作d)に於いて生成した連結産物を分離するには第一およびまたは第二及びまたは第三オリゴヌクレオチドにビオチンを結合させておき、連結反応の後にアビジン結合磁性ビーズ等を用いることが可能である。

【0036】本発明の特定核酸配列を増幅するための試薬は、5'末端から3'末端に向って、少なくともRNAポリメラーゼのプロモーター配列および特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有する第一オリゴヌクレオチド、特定核酸配列の一部の5'上流の一部に相補的な塩基配列を有する第二オリゴヌクレオチド、連結酵素、RNAポリメラーゼ、4種のリボヌクレオチド三リン酸、DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸および反応緩衝液を含む。

【0037】また本発明の核酸配列増幅のための試薬は、上記成分の他に、前記第一および第二オリゴヌクレオチドを連結酵素により連結し、該連結産物を鋳型としRNAポリメラーゼにより合成したRNAと相補的な配列、同じRNAと相同な配列およびRNAポリメラーゼ

【0038】次に例示Cに記載されるRNAをプライマーとする核酸配列増幅方法を説明する。本発明の増幅方法は、下記操作を含むものである。

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくともRNAポリメラーゼのプロモーター配列および特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドを試料と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列と上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

操作b) 前記第一オリゴヌクレオチドをプライマーとして伸張反応させる。

操作c) 操作b)で得られた伸張生成物を一本鎖にし、該伸張生成物の一部に相補的な配列を有する第二オリゴヌクレオチドをアニールさせ、伸張反応させる。

操作d) 操作c)で得られた伸張生成物を鋳型とし、RNAポリメラーゼでRNAを合成させる。

操作e) 操作d)で得られたRNAをプライマーとして、操作d)で得られたRNAと相補的な配列、操作d)で得られたRNAと相同な配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型としてDNAを合成する。。

操作f) 操作e)で合成された2本鎖DNAを鋳型としてRNAを合成する。

操作g) 操作f)で合成されたRNAをプライマーとし操作d)に記載の一本鎖DNA鋳型としてDNAを合成する。

これらの操作は逐次的に又は同時に行なうことができる。

【0039】例示Cに記載されるRNAをプライマーとして、下記増幅を行うこともできる。必要により以下の操作を含む

操作a) 5'末端から3'末端に向って、少なくともRNAポリメラーゼのプロモーター配列および特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有する第一オリゴヌクレオチドを試料と混合して反応させ、試料中の特定核酸配列と上記オリゴヌクレオチドをアニールする。

操作b) 前記第一オリゴヌクレオチドをプライマーとして伸張反応させる。

操作c) 操作b)で得られた伸張生成物を一本鎖にし、該伸張生成物の一部に相補的な配列を有する第二オリゴヌクレオチドをアニールさせ、伸張反応させる。

操作d) 操作c)で得られた伸張生成物を鋳型とし、RNAポリメラーゼでRNAを合成させる。

操作e) 操作d)で得られたRNAをプライマーとして、操作d)で得られたRNAと相補的な配列、操作d)で得られたRNAと相同な配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを鋳型としてDNAを合成する。。

操作f) 操作e)で合成された2本鎖DNAを鋳型としてRNAを合成する。



し操作d)に記載の一本鎖DNA鋳型としてDNAを合成する。

操作h) 操作g)で合成された2本鎖DNAを鋳型としてRNAを合成する。

操作i) 操作h)で合成されたRNAをプライマーとし操作d)に記載の一本鎖DNA鋳型としてDNAを合成する。

操作j) 必要により操作h)および操作i)を所望の核酸量が得られるまで繰り返す。

これらの操作は逐次的に又は同時に行なうことができる。本発明では操作c)で得られた鋳型DNAを分離する操作を含んでいてもよい。

【0040】本発明では、特定核酸の一部と同じ塩基配列を持った伸長生成物を多量に得ることができる。更にこの生成物を測定すれば標的核酸の存在の有無を測定することができる。

【0041】本発明の第一オリゴヌクレオチドは、5'末端から3'末端に向って、少なくとも、RNAポリメラーゼのプロモーター配列と特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有するように設計されており、第二オリゴヌクレオチドは特定核酸配列の一部の3'下流の一部に相補的な塩基配列を有するように設計されている。第二オリゴヌクレオチドは第一オリゴヌクレオチドをプライマーとして伸張反応させた伸長生成物に相補的なように設計されている。第三オリゴヌクレオチドは、第二オリゴヌクレオチドと相補的な配列に設計されていれば、構造、長さに制限されない。一般的に、前記核酸の一部に相補的な塩基配列の長さは、6~100ヌクレオチド、好ましくは10~30ヌクレオチドの長さが使用される。

【0042】本発明の第一オリゴヌクレオチドにおいて、RNAポリメラーゼのプロモーター配列と特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列との間に、所望によりスペーサーを設けることも可能である。このスペーサーは一般的に1~100個、好ましくは1~20個のヌクレオチドであればよい。

【0043】本発明の一本鎖DNAは、少なくとも操作d)で得られたRNAをプライマーとして、操作d)で得られたRNAと相補的な配列、操作d)で得られたRNAと相同な配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含むように設計されていれば、構造、長さに制限されない。一般的に、前記RNAの一部に相補的およびまたは相同な塩基配列の長さは、6~100ヌクレオチド、好ましくは10~30ヌクレオチドの長さが使用される。

【0044】本発明の特定核酸配列を増幅するための試薬は、5'末端から3'末端に向って、少なくともRNAポリメラーゼのプロモーター配列および特定核酸配列の一部に相補的な塩基配列を順次有する第一オリゴヌク

伸張反応させた伸長生成物に相補的な第二オリゴヌクレオチド、RNAポリメラーゼ、4種のリボヌクレオシド三リン酸、DNAポリメラーゼ、4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸および反応緩衝液を含む。

【0045】また本発明は上記成分の他に前記第一オリゴヌクレオチドをプライマーとして伸張反応させた伸張生成物を一本鎖にし、該伸張生成物の一部に相補的な配列を有する第二オリゴヌクレオチドをアニールさせ、伸張反応させ、さらに得られた伸張生成物を鋳型とし、RNAポリメラーゼでRNAを合成させたRNAをプライマーとし、得られたRNAと相補的な配列および該RNAと相同な配列、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む一本鎖DNAを含む。

【0046】本発明における試料中の核酸は単鎖でも二重鎖でも良く、比較的純粋な状態であっても、また混合物の成分であってもよい。本発明では一本鎖DNAを鋳型として、4種のデオキシリボヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼによりDNAを合成し、合成された2本鎖DNAを鋳型として、4種のリボヌクレオチドおよびRNAポリメラーゼを使用してRNAを合成する。このような例えばジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology; 56, 341-361, 1971.) に記載されている。

【0047】本発明における4種のリボヌクレオシド三リン酸とは、rNTP (rATP, rCTP, rGTP, rTTP) である。本発明における4種のデオキシリボヌクレオシド三リン酸とは、dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) である。

【0048】また本発明において使用するRNAポリメラーゼとしては、例えばT3RNAポリメラーゼ、T7RNAポリメラーゼまたはSP6RNAポリメラーゼなどが挙げられる。さらに本発明において使用するDNAポリメラーゼとしては、例えば大腸菌 (E. coli) DNAポリメラーゼ III、クレノウフラグメント (Klenow fragment)、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Thermus aquaticus DNAポリメラーゼ、Thermus thermophilus DNAポリメラーゼ等が挙げられる。

【0049】本発明の核酸配列の検出方法では、試料中の核酸に対して上記操作(a)~(f)または操作(a)~(i)を実施した後(例Aのプライマー)、または操作(a)~(g)または操作(a)~(j)を実施した後(例Bのプライマー)、または(a)~(g)または(a)~(j)を実施した後(例Cのプライマー)、生成物に検出されるべき配列配列及び/又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを加え、該ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定することにより、標的核酸を検出する。

【0050】上記増幅方法による生成物の検出は、一般的な測定法で検出可能である。例えば電気泳動により一



る伸長生成の際に、添加するモノヌクレオチドとして<sup>32</sup>Pなどの標識物を用いて、その放射活性を測定する、標識プローブを用いて検出するなど公知の方法を用いることができる。標識プローブを用いる方法では、標識物として放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、ピオチン、ハプテン等の公知の標識物質を標識した核酸プローブで測定することができる。核酸プローブとしては生成物の一部と相補的塩基配列を持つように設計し、該核酸プローブと、伸長生成物とをハイブリダイズさせ、該

プローブを検出することで実施できる。この場合、標識プローブは新たに生成した配列に対してハイブリダイズするように設計されているので、既に存在している核酸の影響を受けることなく、伸長反応により新たに生成した伸長生成物を、効率よく検出することができる。

#### 【0051】

また、本発明の特定核酸の検出用試薬は、一本鎖DNA、RNA、DNAポリメラーゼ、4種のリボヌクレオチド三リン酸および反応緩衝液ならびに検出されるべき配列及び/又はその変異体とハイブリダイズすることができる標識されたオリゴヌクレオチドプローブを含むものである。本発明の増幅法及び検出法に用いる要素、試薬をそれぞれ用意したキットにすることが可能である。

#### 【0052】

【発明の効果】本発明の増幅法によれば、RNAポリメラーゼで合成されたRNAがプライマーとして作用するよう設計されるので、高い増幅効果が得られる。そのため所望の増幅効果を得るための反応時間が短くてすむ。また試料中に標的核酸が存在する場合にのみ増幅効果が現れるため、検出が容易である。

#### 【0053】

【実施例】次に本発明を実施例及び比較例を用いて説明する。

#### 【0054】参考例1

各種オリゴヌクレオチドの合成

ABI社DNAシンセサイザー391型を用いて、ホスホアミダイト法にて下記配列のオリゴヌクレオチドを各種合成した。

#### 第1オリゴヌクレオチド(56bp): (配列表1)

腸炎ビブリオTDE(Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の102番目から123番目のヌクレオチド配列と相同な配列および同遺伝子の102番目から123番目のヌクレオチド配列と相補的な配列および3つの制限酵素結合配列を有する。配列順序は配列表1に記載されるとおりである。

#### 第2オリゴヌクレオチド(48bp): (配列表2)

腸炎ビブリオTDE 遺伝子の102番目から123番目のヌクレオチド配列と相同な配列および制限酵素結合部位および同遺伝子の102番目から123番目のヌクレオチド配列と相補的な配列を有する。該オリゴヌクレオチドは第1

クレオチドとアニールさせた時、制限酵素結合部位を形成する。

#### 第3オリゴヌクレオチド(47bp): (配列表3)

腸炎ビブリオTDE(Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の82番目から101番目のヌクレオチド配列と相補的な配列およびRNAポリメラーゼのプロモーター配列を有する。

#### 第4オリゴヌクレオチド(22bp): (配列表4)

腸炎ビブリオTDE(Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の102番目から123番目のヌクレオチド配列と相補的な配列を有する。

#### 第5オリゴヌクレオチド(47bp): (配列表5)

RNAポリメラーゼのプロモーター配列および腸炎ビブリオTDE(Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の82番目から101番目のヌクレオチド配列と相同な配列を有する。

#### 第6オリゴヌクレオチド(22bp): (配列表6)

腸炎ビブリオTDE(Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の102番目から123番目のヌクレオチド配列と相同な配列を有する。

【0055】手法はABI社マニュアルに従い、0.2 μMスケールで実施した。必要によりBiotin-ON Phosphoamidite(TOYOBO)を用いて、5'末端にピオチンを結合させて合成した。各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃で一夜実施した。精製はファルマシア社製FPLCで、MonoQカラムまたは日立製作所製HPLCで、逆相カラムにて実施した。なお合成したオリゴヌクレオチドは必要により以下の方法で、5'末端にリン酸基を結合させた。

オリゴヌクレオチド 50~200 pmoles

10× protruding end kinase buffer 10 μl

1 mM ATP 1 μl

T4ポリヌクレオチドキナーゼ(東洋紡製) 10 単位

水を加えて全量を100 μlとして、37℃で1時間反応させた。ここで10× protruding end kinase bufferとは

0.5M Tris-HCl(pH8.0)

0.1M MgCl<sub>2</sub>

0.1M 2-メルカプトエタノール

を示す。

#### 【0056】実施例1

鋳型用一本鎖核酸及びプライマー用二本鎖核酸の調製  
予め5'末端をリン酸化した第1オリゴヌクレオチドおよび第2オリゴヌクレオチドをアニールさせた後、プラスミド・ベクターpTZ18U(ストラタジーン社製)を制限酵素EcoRIおよびSphIで切断した断片と結合させ、大腸菌に形質転換の後、第1オリゴヌクレオチドおよび第2オリゴヌクレオチドを組み込んだプラスミド(pRPTD)を含む大腸菌を分離した。分離した大腸菌を培養の後、二本鎖

を得た(図2)。二本鎖プラスミドは以下の実施例においてプライマーとして使用する。一本鎖プラスミドは以下の実施例において鋳型として使用する。

#### 【0057】実施例2

実施例1で得られた一本鎖プラスミド、sspRPTD 1  $\mu$ g 及び二本鎖プラスミド、dspRPTD をBamHIとPvuIで切断したDNA断片(2つの断片になっていて一方にT7RNAポリメラーゼのプロモーター配列を含む) 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0ngとを各々、下記反応液20  $\mu$ lに加えた。65℃に1分間保温した後、30℃に1分間保温し、T7RNAポリメラーゼ 180単位、ポリメラーゼIII 150単位、 $\beta$ -サブユニット 200単位、RNasin 40単位、一本鎖結合タンパク(SSB) 1mgを加え、30℃、1時間保温した。

#### 反応液

20mM Tris-HCl(pH 8.0)

8mM MgCl<sub>2</sub>

1mM ATP

8mM DTT

80  $\mu$ g/ml BSA

100  $\mu$ M ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

【0058】その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成された二本鎖DNA、dsDNAを確認した(図8)。図8においてレーン1~6はDNA断片100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0ngを順に示す。マーカーは $\lambda$ Hind IIIダイジェストを使用した。図8から明らかなように、2.9Kb付近に二本鎖DNAが合成されていた。これは、二本鎖DNAから切断されたDNAを鋳型としてRNAが合成され、それがプライマーとして一本鎖DNAにアニールし、二本鎖DNAが合成されたことを示している(図3)。

#### 【0059】実施例3

参考例1の第3オリゴヌクレオチドの5'末端をリン酸化したもの 10pmol、第4オリゴヌクレオチド 10pmol、TDH産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸 1ng, 100pgまたは0pgとを共に20  $\mu$ lの下記反応液に加えた。94℃に5分間保った後、37℃に2分間保温し、T4リガーゼを加え、37℃に30分間保温し、第3オリゴヌクレオチドと第4オリゴヌクレオチドを連結させた後、一本鎖プラスミド、sspRPTD 1  $\mu$ gを加えた。94℃に1分間保温した後、30℃に1分間保温し、T7RNAポリメラーゼ 180単位、ポリメラーゼIII 150単位、 $\beta$ -サブユニット 200単位、RNase インヒビター40単位、一本鎖結合タンパク(SSB) 1mgを加え、30℃、1時間保温した。

#### 反応液

20mM Tris-HCl(pH 8.0)

8mM MgCl<sub>2</sub>

1mM ATP

80  $\mu$ g/ml BSA

100  $\mu$ M ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

【0060】その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成されたdsDNAを確認した(図9)。図9においてレーン1~3はゲノム核酸 1ng, 100pg, 0pgのものを順に示す。マーカーは $\lambda$ Hind IIIダイジェストを使用した。図9から明らかなように2.9Kb付近に二本鎖DNA、dsDNAが合成されていた。これは、第3オリゴヌクレオチドと第4オリゴヌクレオチドが連結し、連結されたDNAを鋳型としてRNAが合成され、それがプライマーとして一本鎖DNA、ssDNAにアニールし、二本鎖DNA、dsDNAが合成されたことを示している(図4)。

#### 【0061】実施例4

参考例1の第6オリゴヌクレオチドの5'末端をリン酸化したもの 10pmol、第5オリゴヌクレオチド 10pmol、TDH産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸 1ng, 100pgまたは0gとを共に20  $\mu$ lの下記反応液に加えた。94℃に5分間保った後、37℃に2分間保温し、T4リガーゼを加え、37℃に30分間保温し、第5オリゴヌクレオチドと第6オリゴヌクレオチドを連結させた後、第4オリゴヌクレオチド 10pmol、一本鎖プラスミド、sspRPTD 1  $\mu$ gを加えた。94℃に1分間保温した後、30℃に1分間保温し、T7RNAポリメラーゼ 180単位、ポリメラーゼIII 150単位、 $\beta$ -サブユニット 200単位、RNase インヒビター40単位、一本鎖結合タンパク(SSB) 1mgを加え、30℃、1時間保温した。

#### 反応液

20mM Tris-HCl(pH 8.0)

8mM MgCl<sub>2</sub>

1mM ATP

8mM DTT

80  $\mu$ g/ml BSA

100  $\mu$ M ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

【0062】その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成されたdsDNAを確認した(図10)。図10においてゲノム核酸 1ng, 100pg, 0gのものを順に示す。マーカーは $\lambda$ Hind IIIダイジェストを使用した。図10から明らかなように2.9Kb付近に二本鎖DNA、dsDNAが合成されていた。これは、第5オリゴヌクレオチドと第6オリゴヌクレオチドが連結し、連結されたDNAを鋳型として第4オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、2本鎖のDNAが合成され、そのDNAを鋳型としてRNAが合成され、それがプライマーとして一本鎖DNA、ssDNAにアニールし、二本鎖DNA、dsDNAが合成されたことを示している(図5)。

#### 【0063】実施例5

参考例1の第5オリゴヌクレオチド 10pmol、TDH産性

核酸 1 ng, 100pg または 0 g とを共に 20  $\mu$ l の下記反応液に加えた。94℃に 5 分間保った後、37℃に 2 分間保温し、クレノー DNA ポリメラーゼを 8.3 単位加え、37℃に 30 分間保温し、第 5 オリゴヌクレオチドをプライマーとして DNA 伸張反応をさせた後、第 4 オリゴヌクレオチド 10 pmol、一本鎖プラスミド、sspRPTD 1  $\mu$ g を加えた。94℃に 1 分間保温した後、30℃に 1 分間保温し、T7RNA ポリメラーゼ 180 単位、ポリメラーゼ III 150 単位、 $\beta$ -サブユニット 200 単位、RNase インヒビター 40 単位、一本鎖結合タンパク (SSB) 1 mg を加え、30℃、1 時間保温した。

#### 反応液

20mM Tris-HCl (pH 8.0)

8mM MgCl<sub>2</sub>

1mM ATP

8mM DTT

80  $\mu$ g/ml BSA

100  $\mu$ M ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

【0064】その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成された dsDNA を確認した (図 11)。図 11 においてレーン 1~3 はゲノム核酸 1 ng, 100pg, 0 g のものを順に示す。マーカーは  $\lambda$  Hind III ダイジェストを使用した。図 11 から明らかなように 2.9Kb 付近に二本鎖 DNA、dsDNA が合成されていた。これは、第 5 オリゴヌクレオチドがプライマーとして DNA 伸張物が合成され、その DNA を一本鎖とした後、第 4 オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、2 本鎖の DNA が合成され、その DNA を鋳型として RNA が合成され、それがプライマーとして一本鎖 DNA、ssDNA にアニールし、二本鎖 DNA、dsDNA が合成されたことを示している (図 6)。

#### 【0065】実施例 6

参考例 1 の第 3 オリゴヌクレオチドの 5' 末端をリン酸化したもの 10 pmol、第 4 オリゴヌクレオチドの 5' 末端をビオチン化したもの 10 pmol、TDH 産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸 1 ng, 100pg または 0 g とを共に 20  $\mu$ l の下記連結反応液に加えた。94℃に 5 分間保った後、37℃に 2 分間保温し、T4 リガーゼを 2.7 単位加え、37℃に 30 分間保温し、第 3 オリゴヌクレオチドと第 4 オリゴヌクレオチドを連結させた。ストレプトアビジン結合磁性ビーズ (Dynabeads:M-280) を 40  $\mu$ l 加え混合した後、室温で 10 分間放置した。磁石でビーズを集め、上澄みを捨て TE 緩衝液を加え洗浄した。3 回洗浄した後、0.3N NaOH を 20  $\mu$ l 入れ混合した後、室温に 5 分放置した。TE 緩衝液で 3 回洗浄した後、下記伸張反応液 20  $\mu$ l、一本鎖プラスミド、sspRPTD 1  $\mu$ g を加えた。65℃に 1 分間保温した後、30℃に 1 分間保温し、T7RNA ポリメラーゼ 180 単位、ポリメラー

ゼ III 150 単位、 $\beta$  サブユニット 200 単位、RNase インヒビター 40 単位、一本鎖結合タンパク (SSB) 1 mg を加え、30℃、1 時間保温した。

#### 連結反応液

10mM Tris-HCl (pH 7.6)

7mM MgCl<sub>2</sub>

10mM DTT

1mM ATP

#### 伸張反応液

20mM Tris-HCl (pH 8.0)

8mM MgCl<sub>2</sub>

1mM ATP

8mM DTT

80  $\mu$ g/ml BSA

100  $\mu$ M ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP

【0066】その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成された dsDNA を確認した (図 12)。図 12 においてレーン 1~3 はゲノム核酸 1 ng, 100pg, 0 g のものを順に示す。マーカーは  $\lambda$  Hind III ダイジェストを使用した。図 5 から明らかなように 2.9Kb 付近に二本鎖 DNA、dsDNA が合成されていた。これは、第 3 オリゴヌクレオチドと第 4 オリゴヌクレオチドが連結し、連結された DNA を鋳型として RNA が合成され、それがプライマーとして一本鎖 DNA、ssDNA にアニールし、二本鎖 DNA、dsDNA が合成されたことを示している (図 7)。

#### 【0067】

##### 【配列表】

配列番号: 1

30 配列の長さ: 56

配列の型: 核酸

トポロジー: 一本鎖

配列の種類: 他の核酸 合成 DNA

配列の特徴

存在位置: 1..4

特徴を決定した方法: S

他の特徴: 制限酵素結合部位

存在位置: 5..26

40 他の特徴: 腸炎ビブリオ TDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の 102 番目から 123 番目のヌクレオチド配列と相同な配列を有する。

存在位置: 27..30

他の特徴: 制限酵素結合部位

存在位置: 31..52

他の特徴: 腸炎ビブリオ TDH (Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の 102 番目から 123 番目のヌクレオチド配列と相補的な配列を有する。

存在位置: 53..56

他の特徴: 制限酵素結合部位

19

20

AATTCCTCCGG TTCTGATGAG ATATTGGATC CAATATCTCA TCAGAACCGG GGCATG

56

【0068】配列番号:2

配列の長さ:48

配列の型:核酸

トポロジー:一本鎖

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置:1..22

特徴を決定した方法:S

他の特徴:腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haem \*10

配列

CCCCGGTTCT GATGAGATAT TGGATCCAAT ATCTCATCAG AACCGGGG

48

【0069】配列番号:3

配列の長さ:47

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

GCATGAAAG GGACAGATGG CTCCTATAG TGAGTCGTAT TAGAATT

47

【0070】配列番号:4

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

CAATATCTCA TCAGAACCGG GG

22

【0071】配列番号:5

配列の長さ:47

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列の特徴

配列

AATTCTAATA CGACTCACTA TAGGGAGCCA TCTGTCCCTT TTCATGC

47

【0072】配列番号:6

配列の長さ:22

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

配列

CCCCGGTTCT GATGAGATAT TG

22

【図面の簡単な説明】

【図1】第1~6オリゴヌクレオチドを示す。

【図2】実施例1における一本鎖プラスミドおよび二本

\*olysin) 遺伝子の102番目から123 番目のヌクレオチド  
配列と相同な配列を有する。

存在位置:23..26

他の特徴:制限酵素結合部位

存在位置:27..48

他の特徴:腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haem  
olysin) 遺伝子の102番目から123 番目のヌクレオチド  
配列と相補的な配列を有する。

※存在位置:1..20

特徴を決定した方法:S

他の特徴:腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haem  
olysin) 遺伝子の82番目から101 番目のヌクレオチド  
配列と相補的な配列を有する。

存在位置:21..47

※ 他の特徴:T7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列

★配列の特徴

存在位置:1..22

特徴を決定した方法:S

他の特徴:腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haem  
olysin) 遺伝子の102番目から123 番目のヌクレオチド  
配列と相補的な配列を有する。

★

30 ☆存在位置:1..27

特徴を決定した方法:S

他の特徴:T7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列

存在位置:28..47

他の特徴:腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haem  
olysin) 遺伝子の82番目から101 番目のヌクレオチド  
配列と相補的な配列を有する。

☆

◆配列の特徴

40 存在位置:1..22

特徴を決定した方法:S

他の特徴:腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haem  
olysin) 遺伝子の102番目から123 番目のヌクレオチド  
配列と相同な配列を有する。

◆

【図3】実施例2における二本鎖プラスミドの構築を示す。

【図4】実施例3における二本鎖プラスミドの構築を示す。

【図5】実施例4における二本鎖プラスミドの構築を示す。

【図6】実施例5における二本鎖プラスミドの構築を示す。

【図7】実施例6における二本鎖プラスミドの構築を示す。

【図8】実施例2における増幅産物の電気泳動を示す。

【図9】実施例3における増幅産物の電気泳動を示す。

【図10】実施例4における増幅産物の電気泳動を示す。

【図11】実施例5における増幅産物の電気泳動を示す。

【図12】実施例6における増幅産物の電気泳動を示す。

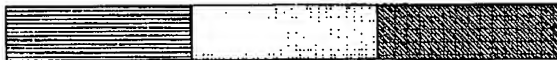
【図1】

第1オリゴヌクレオチド 56bp (配列番号1)



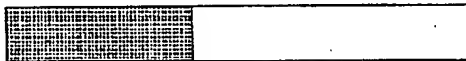
1～4 制限酵素 5～26相同配列 27～30制限酵素 31～52相補配列 53～56制限酵素

第2オリゴヌクレオチド (配列番号2)



1～22相同配列 23～26制限酵素 27～48相補配列

第3オリゴヌクレオチド 47bp (配列番号3)



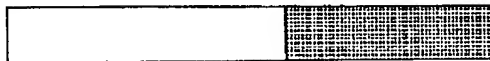
1～20相補配列 21～47プロモーター配列

第4オリゴヌクレオチド 22bp (配列番号4)



1～22 相補配列

第5オリゴヌクレオチド 47bp (配列番号5)



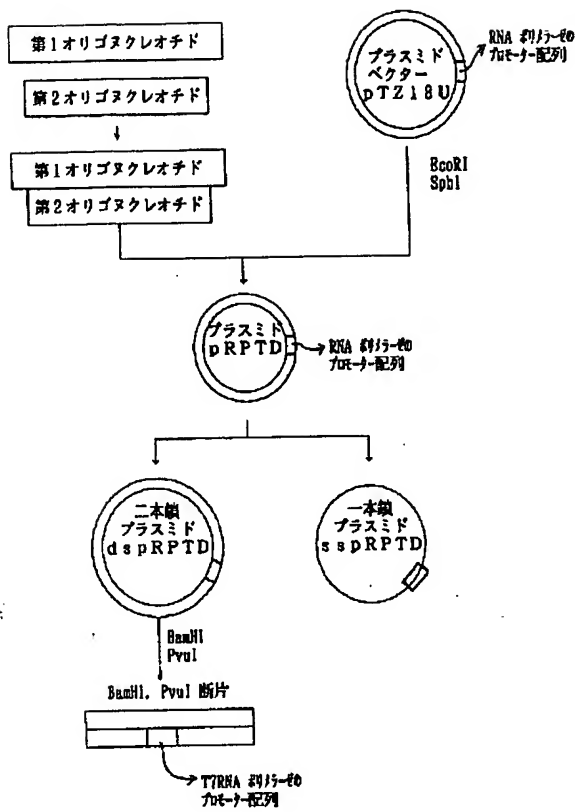
1～27プロモーター配列 28～47 相補配列

第6オリゴヌクレオチド 22bp (配列番号6)

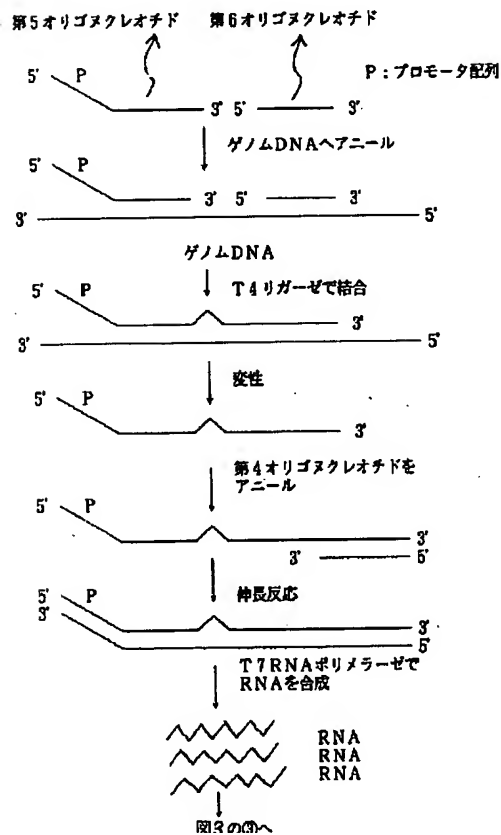


1～22 相同配列

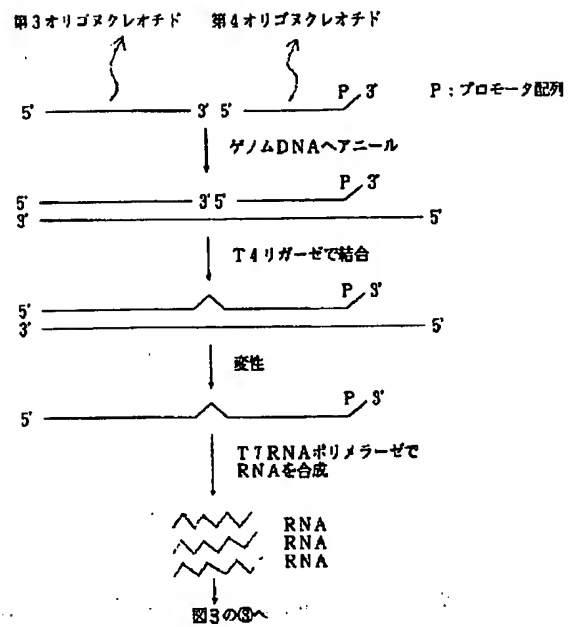
【図2】



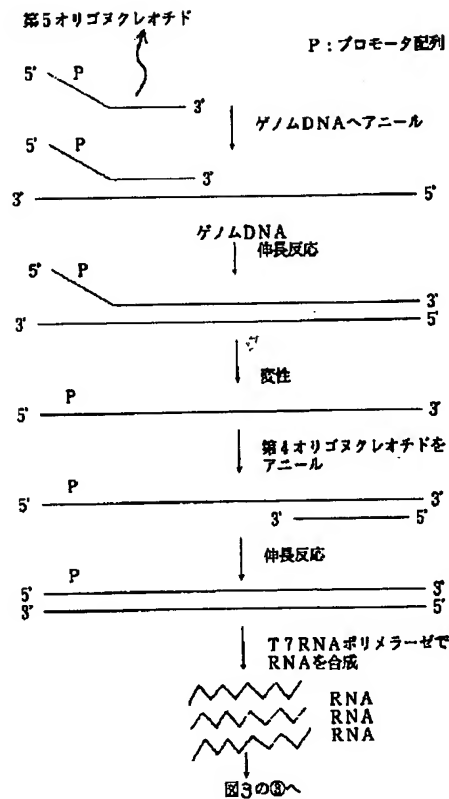
【図5】



【図4】

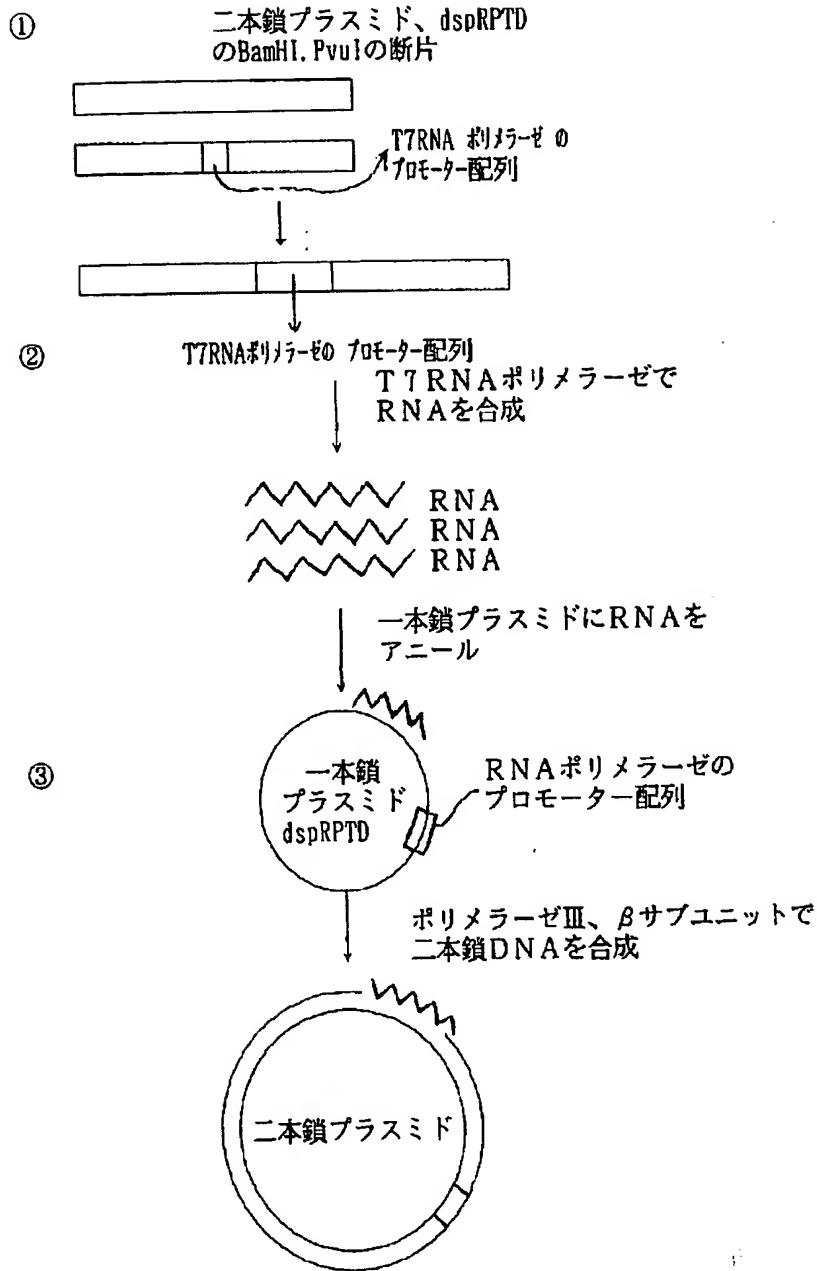


【図6】

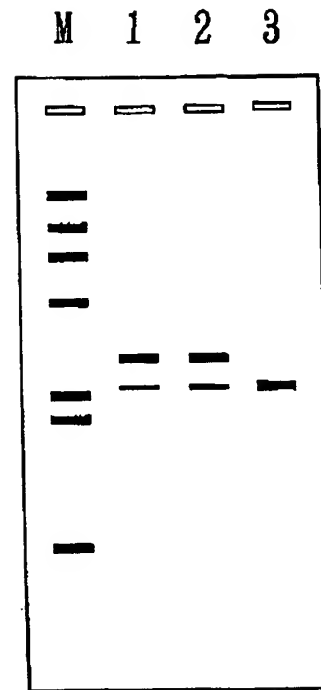




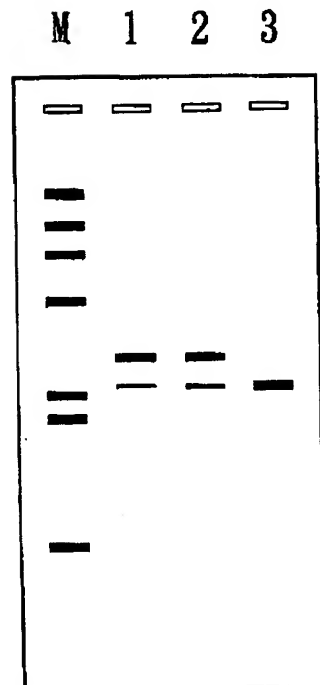
【図3】



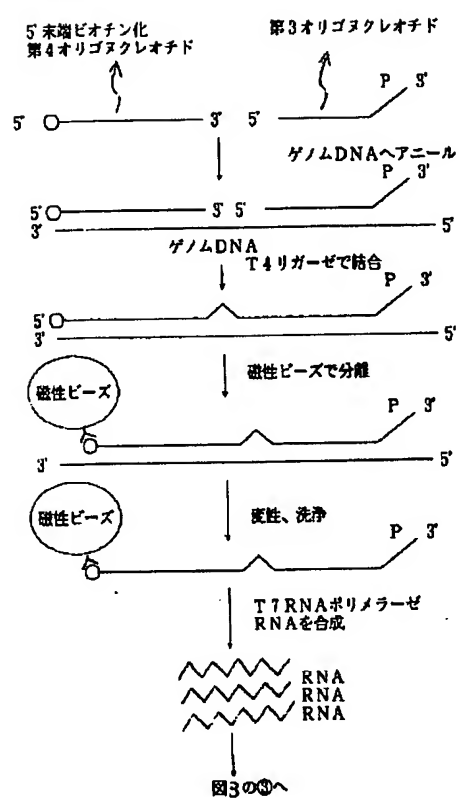
【図9】



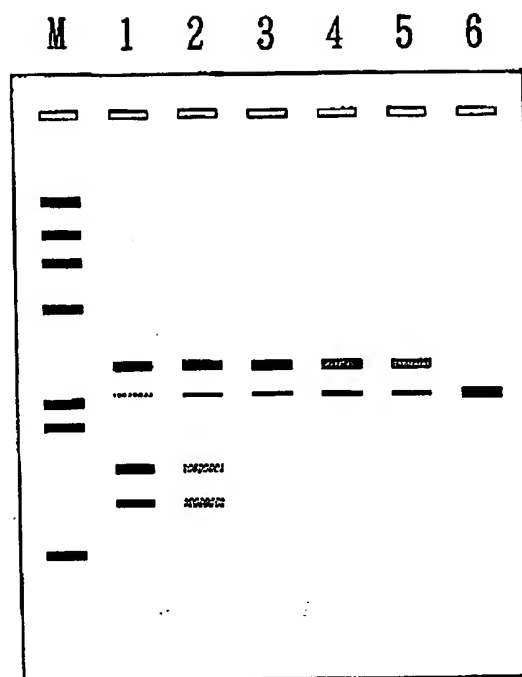
【図10】



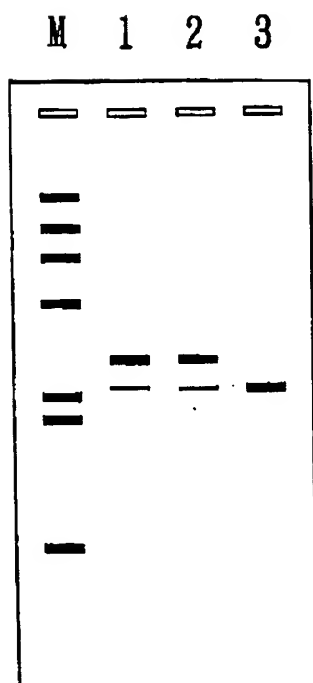
【図7】



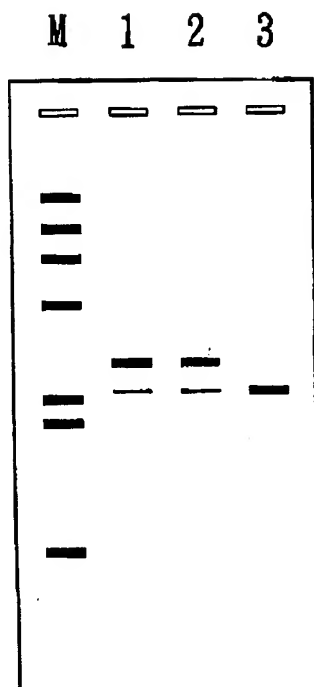
【図8】



【図11】



【図12】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**